

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : A61K 39/395 // (A61K 39/395, 37:02) (A61K 39/395, 31:52) (A61K 39/395, 31:57)</p>	A1	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/16728</p> <p>(43) Date de publication internationale: 4 août 1994 (04.08.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00071</p> <p>(22) Date de dépôt international: 21 janvier 1994 (21.01.94)</p> <p>(30) Données relatives à la priorité: 93/00584 21 janvier 1993 (21.01.93) FR</p> <p>(71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): PASTEUR MERIEUX SERUMS ET VACCINS S.A. [FR/FR]; 58, avenue Leclerc, F-69007 Lyon (FR).</p> <p>(72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): ALBERICI, Gilles [FR/FR]; 3, rue Gabriel-Chevalier, F-69009 Lyon (FR). CAUDRELIER, Pierre [FR/FR]; 5F, chemin de Parsonge, F-69570 Dardilly (FR). HOURMANT, Maryvonne [FR/FR]; 14, rue de Neuville, F-44000 Nantes (FR). LE MAUFF, Brigitte [FR/FR]; 4, avenue des Danois, F-44300 Nantes (FR). SOULILLOU, Jean-Paul [FR/FR]; 32 ter, rue de l'Abbaye, F-44000 Nantes (FR).</p> <p>(74) Mandataires: BERNASCONI, Jean etc.; Cabinet Lemoine et Bernasconi, 13, boulevard des Batignolles, F-75008 Paris (FR).</p>		<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Publiée</p> <p><i>Avec rapport de recherche internationale. Avant l'expiration du délai prévu pour la modification des revendications, sera republiée si de telles modifications sont reçues.</i></p>
<p>(54) Title: MONOCLONAL ANTI-LFA-1 ANTIBODIES FOR THE PREPARATION OF A MEDICAMENT INTENDED TO PREVENT THE REJECTION OF ORGAN TRANSPLANTS</p>		
<p>(54) Titre: ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-LFA-1 POUR LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT DESTINE A PREVENIR LE REJET DES GREFFES D'ORGANES</p>		
<p>(57) Abstract</p>		
<p>The medicament comprises as active ingredient at least a monoclonal antibody directed against the humain molecule LFA-1 in isotonic aqueous solution for perfusion and at least one stabilizing agent such as tris(hydroxymethyl)aminomethane and the Tween ®80. For a solution of 1 litre, the medicament may comprise from 0.1 to 10 g, particularly approximately 1 g of monoclonal antibody, and from 0.1 to 10 g, particularly 2.4 g of tris(hydroxyméthyl)aminomethane or analogue and from 0.1 to 10, and particularly 2 per 10 thousand Tween ®80.</p>		
<p>(57) Abrégé</p>		
<p>Le médicament comprend à titre de principe actif au moins un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 humaine en solution aqueuse isotonique pour perfusion et au moins un agent de stabilisation tel que le tris (hydroxyméthyle) aminométhane et le Tween ®80. Pour une solution d'un litre, le médicament peut comprendre de 0,1 à 10 g, notamment 1 g environ d'anticorps monoclonal, et de 0,1 à 10 g, notamment 2,4 g de tris (hydroxyméthyle) aminométhane ou analogue et de 0,1 à 10, et notamment 2 pour dix mille de Tween ®80.</p>		

UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brsil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

ANTICORPS MONOCLONAUX ANTI-LFA-1 POUR LA PREPARATION D'UN MEDICAMENT
DESTINE A PREVENIR LE REJET DES GREFFES D'ORGANES

Utilisation d'anticorps monoclonaux anti-LFA-1 pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir le rejet des greffes d'organes solides et médicaments obtenus.

5 La présente invention concerne l'utilisation d'anticorps monoclonaux pour la préparation d'un médicament pour la prévention du rejet des greffes d'organes solides, des médicaments les comprenant et un kit médical pour assurer cette prévention. Par organes solides, on entend
10 notamment le rein, le coeur, les poumons, le foie, la peau ainsi que des glandes endocrines telles que les glandes pituitaires, la thyroïde, le pancréas, et des suspensions cellulaires extraits de ceux-ci (par exemple îlots de Langerhans), etc.

15 La dernière décennie a vu une amélioration des résultats des transplantations d'organes, notamment de reins, se traduisant par une amélioration de la survie des patients et des greffons. Avant 1981, l'utilisation d'Azathioprine (AZA) et de Prednisone (P) constituait
20 l'immunosuppression prophylactique de base en matière de transplantation rénale, malgré un taux relativement faible de survie du greffon. L'apparition de la Cyclosporine A (CsA) a permis d'améliorer significativement la survie des greffons, approximativement de 90 % à un an (in "Annual
25 Report of United Network for Organ Sharing" 1989, UNOS Eds. Richmond - J.M. Cecka et al., The UNOS scientific renal

transplant registry, In "Clinical transplants" 1989 : 1-8
UCLA Eds. Los Angeles) avec une survie prolongée des
patients (environ 95 % sur un an), mais avec comme
contrepartie des problèmes de toxicité non négligeables. On
5 a également inclus des anticorps antilymphocytaires
polyclonaux et monoclonaux dans des protocoles de
prophylaxie et de traitement curatif de rejet.

On a pu montrer de faibles taux de rejet précoce
des greffons par un traitement en deux temps comprenant
10 initialement l'utilisation d'anticorps polyclonaux
antilymphocytaires puis de CsA à titre d'immunosuppresseur
principal de maintenance (A.J. Richardson et al., Transplant
Internat 1990 ; 3 : 26-31 - B.G. Sommer et al.,
Transplantation 1987 ; 43 : 85-90).

15 L'arrivée des anticorps monoclonaux (mAb) à
spécificité déterminée a permis d'envisager une action plus
précise en termes d'induction d'immunosuppression et de
traitement des épisodes de rejet. Jusqu'à présent, seul
l'anticorps OKT3 (mAb anti-CD3) a reçu une autorisation de
20 mise sur le marché pour le traitement curatif des épisodes
de rejet de greffe rénale (Orthoclone OKT[®]3, Product
Information, Physicians' Desk Reference, 43ème Edition
(Medical Economics Company Inc., N.J. Oradell, 1989, pages
1500-1501). On ne dispose cependant que de peu de preuves de
25 son efficacité pour la prévention des rejets de greffe de
rein (en combinaison avec une immunosuppression chimique).
Pour l'instant, aucun anticorps monoclonal n'a été reconnu
pour cette indication.

La molécule LFA-1 (molécule de fonction
30 lymphocytaire) est une intégrine qui appartient au complexe
d'adhésion lymphocytaire qui intervient dans les phénomènes

d'adhésion cellulaire et de communication intercellulaire et qui accroît notamment les interactions entre lymphocytes auxiliaires et leurs cellules cibles. Cette famille de produits inclut les molécules Mac1, LFA-1 et Gp150,95 qui présentent une chaîne bêta commune de 95 kD et se distinguent les unes les autres par leur chaîne alpha. La protéine LFA-1 ou CD11a/CD18 est un dimère de 180 kD présent à la surface des cellules de moelle osseuse (lignées leucocytaires), des lymphocytes T, des cellules NK, des polynucléaires et des macrophages/monocytes. In vitro, des anticorps monoclonaux dirigés contre LFA-1 inhibent la plupart des activités des cellules T.

L'anticorps anti-LFA-1 a été utilisé chez l'enfant pour la greffe de moelle osseuse HLA incompatible (A. Fischer et al., Lancet 1986 ; ii, (8515) : 1058-1061 - N. Perez et al., Bone Marrow Transplant 1989 ; 4 : 379-384). Les anticorps anti-LFA-1 ont également été utilisés chez des patients leucémiques adultes pour prévenir un rejet de greffe de moelle osseuse à HLA et déplétée en cellules T (D. Maraninchi et al., Bone Marrow Transplant 1989 ; 4 : 147-150). Ils ont également été utilisés pour traiter 10 patients présentant une réaction aiguë du greffon contre l'hôte résistant aux traitements par les stéroïdes (A.M. Stoppa et al., Transplant Int. 1991 ; 4 : 3-7).

En matière de transplantation rénale, les anticorps monoclonaux anti-LFA-1 ont été utilisés chez sept patients pour traiter des épisodes de rejet de greffe aigu (B. Le Mauff et al., Transplantation 1991 ; 52, (2) : 291-296). Il s'agit de l'anticorps monoclonal dénommé 25.3. La tolérance était bonne chez les six patients qui ont reçu plus d'une administration de cet anticorps. Des infections

ont été rapportées chez deux patients. Cependant, un seul patient, probablement celui faisant l'épisode de rejet le plus faible, a recouvré sa fonction rénale avant rejet et un traitement de secours a dû être mis en oeuvre chez cinq d'entre eux. En conclusion cet anticorps a été considéré
5 comme inefficace pour traiter le rejet aigu survenant au décours des greffes de rein. L'application à la prévention du rejet n'a pas été étudiée.

P.J. Berlin et al., Transplantation, Vol 53, n° 4, 1992, Baltimore MD, USA, ont décrit une certaine efficacité
10 de l'administration d'anticorps anti LFA-1 pour bloquer l'activité des cellules T pendant le rejet d'une allogreffe cutanée chez le singe et une légère prolongation de la survie du greffon avant le rejet. Le seul greffon survivant
15 à trois mois correspond à un traitement associant un anti CD11 à un anti-CD2.

Des anticorps monoclonaux dirigés contre ICAM-1, le ligand naturel de LFA-1, ont montré certains résultats dans le rejet de greffe de rein chez des primates (B.A. Cosimi et al. Leukocyte Adhesion Molecules 1989 : 274). Les
20 auteurs suggèrent qu'un traitement combinant les anticorps anti ICAM-1 et anti LFA-1 pourrait être plus efficace (B.A. Cosimi et al. J. of Immunol., 1990, vol 144, No. 12, 4604-4612).

M. Isobe, Proceedings of Int. Congress of Immunol. Budapest, Août 23-28, 1992 (Ed Hungarian Soc. for Immunol.) Springer, Berlin, 1992, 554, W-90-19, suggère également un
25 effet de synergie des monoclonaux anti ICAM-1 et anti LFA-1 dans la tolérance d'allogreffes chez le rongeur.

L'état de la technique, tout en reconnaissant aux
30 anticorps anti LFA-1, certaines propriétés utiles, ne

suggère donc pas d'utiliser ces anticorps pour la prévention du rejet de greffes d'organes solides, sauf sous la forme d'associations avec d'autres anticorps impliqués également dans les phénomènes d'adhésion cellulaire.

5 La demanderesse a maintenant trouvé qu'il était possible de prévenir le rejet des greffes d'organes solides, tels que le rein, par l'administration d'anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 (CD11a/CD18) humaine et ce, sans association avec d'autres anticorps ni
10 avec la cyclosporine A.

Elle a également trouvé que l'efficacité de cette utilisation était grandement subordonnée à un protocole original d'administration.

15 La présente invention a donc pour objet l'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule LFA-1 humaine pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de base de la prévention du rejet de greffes d'organes solides, notamment le rein, chez l'homme. Les anticorps monoclonaux sont de préférence dirigés contre
20 la chaîne alpha de la molécule LFA-1.

Par anticorps dans le sens de la présente invention on entend les anticorps humains, non humains, par exemple murins, humanisés, chimériques, recombinants, ou autres, ainsi que les dérivés d'anticorps, fragments, etc.
25 Tous ces anticorps, y compris les dérivés, peuvent être préparés par les méthodes classiques.

On peut caractériser notamment les anticorps monoclonaux utiles dans l'invention par le fait qu'ils réagissent avec :

30 - les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages et les polymorphonucléaires ;

- 60 % environ des thymocytes et prothymocytes ;
- des lignées de cellules T (par exemple lignées MOLT-4, HPB-ALL et CEM) ;
- la lignée KG1, isolée à partir d'une leucémie myéloïde aiguë.

5

Les anticorps monoclonaux selon l'invention ont pour objectif de bloquer la molécule LFA-1 et de réduire ainsi les interactions intercellulaires. L'anticorps monoclonal doit inhiber l'adhésion et les fonctions effectrices des cellules T et des cellules NK.

10

Outre les propriétés de liaison définies ci-dessus avec les différentes classes cellulaires, les anticorps monoclonaux selon l'invention ont avantageusement tout ou partie des propriétés suivantes in vitro :

15

- inhibition de la réaction lymphocytaire mixte et partiellement des proliférations induites par la phytohémagglutinine (PHA) ;

- inhibition de la cytotoxicité T-dépendante et de la cytotoxicité NK ;

20

- altération du pouvoir d'adhésion des polynucléaires sur le verre ;

- absence de réaction avec la membrane des leucocytes d'enfants souffrant d'une immunodéficience congénitale en récepteur LFA-1 CR3 et complexe Gp 150, 95 ;

25

- inhibition de la fixation de la composante C3bi du complément sur son récepteur CR3 ;

- inhibition de l'activité productrice d'anticorps des cellules T helper spécifiques de l'antigène ;

30

- inhibition partielle de la prolifération des cellules T induite par l'antigène ;

- absence de prolifération cellulaire et de

production de $\text{TNF-}\alpha$;

- diminution (à forte concentration) des réponses prolifératives induites par les mitogènes PMA, ConA, PWM et OKT3 en solution ;

5 - diminution des cellules blastiques et de l'expression de la chaîne α du récepteur de l'IL-2 (CD25) ;

 - diminution des réponses prolifératives des suspensions cellulaires appauvries en monocytes stimulées par SEB ou des cellules B alloréactives traitées à la mitomycine (MLR).

10

De préférence, l'anticorps monoclonal sera une IgG1 de souris et notamment anticorps 25.3 (référence interne 25.3.1.19.3B7), également désigné 25.3.1 dans le Lencocyte Typing III, Oxford 21-26 Sept 1986, déposé auprès de la collection ECACC sous la référence 92 120 309 le 3

15

décembre 1992.

L'anticorps monoclonal destiné à prévenir le rejet de greffes d'organes solides chez un receveur est de préférence administré à raison d'environ 1 à 50 mg/jour, notamment d'environ 15 à 20 mg/jour ; de préférence sur une

20

période allant de 1 à 30 j., notamment de 3 à 14 ; de préférence par perfusion, notamment de l'ordre de 30 min.

L'invention a également pour objet un médicament comprenant à titre de principe actif au moins un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 humaine en

25

solution isotonique à 1 mg/ml environ dans un véhicule approprié.

L'invention a également pour objet un médicament comprenant à titre de principe actif au moins un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 humaine en

30

solution aqueuse isotonique pour perfusion et des agents de

stabilisation tels que le tris (hydroxyméthyl) aminométhane et le Tween 80.

De préférence, pour une solution d'un litre, le médicament en solution comprend de 0,1 à 10 g, notamment 1 g, environ, d'anticorps monoclonal, et de 0,1 à 10 g, notamment 2,4 g, environ, de tris (hydroxyméthyl) aminométhane ou analogue, et de 0,1 à 10 mille de Tween 80, notamment 2 pour dix mille, dans un soluté isotonique.

Les médicaments selon l'invention comprennent de préférence un anticorps monoclonal dirigé contre la chaîne alpha de la molécule LFA-1 et plus particulièrement un anticorps monoclonal tel que défini ci-dessus.

L'invention a encore pour objet un kit destiné à l'administration simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en vue de la prévention des rejets de greffes d'organes solides, comprenant :

- un médicament dont le principe actif est au moins un anticorps dirigé contre la molécule anti-LFA-1, de préférence un anticorps monoclonal du type décrit ci-dessus,
- et au moins un autre composé actif en matière de prévention du rejet des greffes d'organes, notamment choisi parmi les composés suivants :

- . le Tacrolimus (Fk 506),
- . l'Azathioprine,
- . un stéroïde, tel que la Prednisone ou un corticostéroïde équivalent,
- la cyclosporine A.

L'invention a encore pour objet un procédé pour la prévention du rejet des greffes d'organes solides tels que le rein, dans lequel on administre au moins un anticorps monoclonal anti-LFA-1 tel que décrit ci-dessus et

éventuellement au moins un autre agent choisi parmi ceux du kit ci-dessus. De préférence, l'anticorps monoclonal est administré à raison de 1 à 50 mg/jour, notamment d'environ 20 mg/jour ; de préférence par perfusion, notamment de l'ordre de 30 min.

Plus particulièrement l'invention a pour objet un procédé pour la prévention du rejet des greffes d'organes solides, tels que le rein, caractérisé en ce que l'on administre une dose initiale d'un anticorps anti-LFA-1 peu de temps, notamment dans les deux heures, par exemple une heure, avant le rétablissement de la continuité vasculaire du greffon implanté, puis des doses quotidiennes pendant environ 9 jours.

La dose initiale est de préférence de 30 mg (2 x 15 mg) et les doses suivantes, chez l'adulte, sont avantageusement de l'ordre de 15 mg, administrées de préférence par perfusion dans une veine périphérique.

Le dosage, rapporté au poids, est plus important chez l'enfant.

Le procédé de prévention est remarquable en ce qu'il peut-être avantageusement conduit sans autre médication majeure, en particulier sans autre anticorps-monoclonal ou gamma globulines anti-T, et sans cyclosporine.

De façon avantageuse un traitement à la cyclosporine peut être mis en oeuvre le 9ème ou 10ème jour au moment de l'arrêt du traitement anti-LFA-1.

Le procédé selon l'invention peut, par ailleurs, être associé au traitement par corticoïdes et azathioprine habituel.

L'invention va être maintenant décrite plus en détail à l'aide d'un mode de réalisation de l'invention.

L'anticorps monoclonal 25.3 est récolté après culture en fermenteurs dans un milieu sans protéine. Les surnageants hebdomadaires sont concentré puis purifiés par trois étapes chromatographiques sur Q-Sepharose FF, puis S-sepharose FF, puis Q-Sepharose FF.

On prépare des flacons de 5 ml d'anticorps 25.3 en concentration de 1 mg/ml :

- anticorps..... 5 mg,
- tris (hydroxyméthyl) aminométhane..... 12,1 mg,
- NaCl..... 43,5 mg,
- Tween 80..... 1 mg,
- Eau pour injection qs..... 5 ml,

Des traitements immunosuppresseurs peuvent être associés :

- Cyclosporine A (SANDIMMUM[®]) : à raison de 8 à 10 mg/kg/jour par voie orale à partir du 9ème jour après la greffe ; en une à deux administrations par jour pendant une durée indéterminée ; ou par voie intraveineuse à raison de 2 à 4 mg/kg/jour.

- Azathioprine (Imurel[®]) : à raison de 2 mg/kg/j à partir du jour de la greffe, par voie orale ou intraveineuse, pour une dose totale de 25 mg ; administration en une fois ; la dose journalière peut aller de 2 à 2,5 mg/kg.

- Stéroïdes : à raison de 1 mg/kg/j de Prednisone ou d'un corticostéroïde équivalent, aux jours 1 à 5, par voie orale ; à partir du 6ème jour, on diminue la dose tous les 5 jours de 10 mg, puis arrêt total au 45ème jour.

Des traitements divers peuvent être associés si besoin est ; par exemple :

- antifongique oral tel qu'amphotéricine B

(Fungizone[®]) à raison de 1.5 mg/jour pendant un mois,

- antibiotique tel que Sulfaméthoxazole-Triméthoprine (Bactrim[®]) à raison de 800 mg/jour pendant 3 mois,

5 - traitement contre la fièvre : par exemple paracétamol par voie orale à raison de 650 mg, selon les besoins,

- traitement contre le prurit à l'aide d'un antihistaminique tel que la diphenhydramine à raison de 50 mg par voie orale, selon les besoins.

10 **Expérience clinique en prophylaxie du rejet de greffe de rein.**

Un essai clinique de phase II, monocentrique, ouvert, non randomisé, est réalisé chez quinze patients devant subir une 1ère transplantation rénale.

15 Le premier patient a été inclus le 25 mai 1992. Tous les patients ont été suivis trois mois post-greffe.

Les cinq premiers patients (patients 1 à 5) ont reçu 20 mg/jour d'anticorps anti-LFA1 25.3 pendant 10 jours. Au vu des résultats cliniques et biologiques obtenus dans ce premier groupe, les cinq patients suivants (patients 6 à 10) ont reçu 15 mg/jour. Les cinq derniers patients ont reçu 10 mg/jour (patients 11 à 15).

25 **Critères d'inclusion.**

Première greffe de rein de cadavre, receveur entre 18 et 60 ans, donneur entre 10 et 60 ans, durée d'ischémie froide < 48 h, et obtention d'un consentement de participation signé.

30 **Protocole de traitement utilisé.**

L'anticorps est perfusé par voie intraveineuse sur

une durée de 30 minutes, des jours J1 (jour de la transplantation) à J10.

Par rapport au protocole standard de triple
thérapie utilisé habituellement dans le centre,
l'introduction de la cyclosporine est retardée au 9ème jour
post-transplantation afin d'atteindre les taux résiduels
recommandés lors de l'interruption de l'anti-LFA1 (à J10).
L'azathioprine est administrée à la dose de 2 mg/kg/jour
à partir de J1 à 5, puis réduit de 10 mg tous les 5 jours à
partir de J6 et interrompu à J45 post-transplantation.
Tolérance aux injections.

La tolérance immédiate aux injections est
excellente : tous les patients ont reçu la totalité du
traitement. Il n'a pas été observé de différence entre les
groupes (20 ou 15 mg) en terme de tolérance à l'injection
d'anti-LFA-1.

Tolérance biologique : la moitié des patients
s'est immunisé contre l'anticorps mais l'immunisation est
toujours survenue après le dernier jour de traitement (entre
J12 et J30).

Evolution clinique - Tableau résumé

Nombre de patients		5	5	5
Nombre de patients évaluable		5	5	4 *
Anti-LFA1 (mg/jour) 10 jours		20	15	10
Suivi moyen (jours)		90	90	90
Arrêt de traitement		0	0	0
Immunisation	à J15	3/5	0/5	2/4
	à J30	3/5	2/5	1/4
Episodes de rejet				
	avant J10	0	0	0
	de J10 à J30	0	0	0
	de J30 à J90	1	3	2
	(nb de patients)	(1)	(2)	(2)
Episodes infectieux		0	3 (2 CMV; 1 Candidose)	4 (2 CMV 1 Candidose 1 Pnelonephrite)
Créatinémie (micromol/l)				
Moyenne \pm s.e.m. (n=5)	J1	545 \pm 221	516 \pm 137	617 \pm 135
	J30	148 \pm 20	229 \pm 109	140 \pm 38
	J90	167 \pm 48	186 \pm 118	133 \pm 22

* 1 cas de thrombose artérielle immédiate

Tous les patients sont en vie et ont une greffe fonctionnelle à 3 mois post-greffe à l'exception d'un patient du groupe 3 qui a perdu son greffon par thrombose artérielle immédiate sans rapport avec un phénomène de rejet.

Aucun épisode de rejet sous traitement anti-LFA1 n'a été observé. Six patients ont présenté au moins un épisode de rejet (entre le premier et le deuxième mois). Ces épisodes de rejet ont tous été résolus par des traitements conventionnels.

Le suivi biologique de l'étude a comporté l'étude de plusieurs paramètres.

La mesure des taux d'anticorps circulants a été effectuée par un test immunoenzymatique détectant les immunoglobulines (Ig) de souris dans le sérum en référence à une courbe étalon de 25.3 purifié. Les deux groupes 20 et 15 mg présentent des taux élevés de 25.3 circulants atteignant en moyenne 12 et 10 $\mu\text{g/ml}$ à la fin du traitement. La différence entre les premier et deuxième groupes n'est pas statistiquement significative, et le 25.3 est encore détectable dans les deux groupes à J14, voire J20 pour certains patients. Dans le troisième groupe les taux étaient nettement plus faibles et dispersés mais néanmoins significatifs quatre jours après la dernière injection.

L'anticorps n'entraîne pas de modification majeure du nombre de cellules circulantes, il n'est donc pas déplétant. Par contre les cellules circulantes et en particulier les lymphocytes et les monocytes sont recouverts de 25.3 de façon saturante. En effet, lorsque les cellules des patients sont étudiées en cytofluorométrie, le marquage obtenu avec un anticorps anti-souris couplé à la

fluorescéines est de même intensité avec ou sans marquage préalable in vitro avec une quantité saturante de 25.3 (20 µg/mg). Cette saturation s'observe encore à J14 pour 3/5 des patients du groupe I et pour tous les patients du groupe II.

5 La présence de l'anticorps circulant et la saturation des cellules s'accompagne d'un blocage fonctionnel des cellules mis en évidence au niveau des capacités d'adhésion des lymphocytes T. Il est connu que les molécules LFA1/ICAM-1 sont impliquées dans l'adhésion
10 hétérotypique des lymphocytes T à des cellules cibles lymphoblastoïdes B.

Il a donc été mis au point un test d'adhésion entre les lymphocytes T du sang circulant et une lignée B (Daudi). Les lymphocytes sont isolés sur gradient de Ficoll, puis marqués avec un anti-CD3 couplé à la phycoérythrine (7
15 µg/ml) et la lignée B est marquée en immunofluorescence indirecte avec un anticorps monoclonal anti-Daudi, puis un anticorps anti-souris couplé à la fluorescéine. Les cellules reprises en milieu RPMI sont mises en présence dans un rapport 1:1 (cellules mononuclées : Daudi) et incubées soit
20 à 4°C, soit à 37°C (avec et sans addition de 25.3, 15 µg/ml). La réaction est arrêtée par addition de 2 volumes de milieu froid et les cellules sont conservées à 4°C jusqu'à l'analyse en cytométrie dans les 2 h qui suivent. Lors de
25 l'analyse, on mesure parmi les cellules CD3+ celles qui sont doublement positives. Ces événements doublement positifs correspondent à des conjugués T-Daudi comme le confirme l'augmentation apparente de taille (x2 ou x3) des cellules CD3+ "doublement" marquées. Le nombre de conjugués
30 correspond au pourcentage de conjugués obtenus à 37°C, moins le pourcentage obtenu en présence de 25.3 à 15 µg/ml.

Les résultats obtenus avec les cellules des patients sont exprimés sous la forme d'un index d'adhésion, c'est-à-dire rapportées aux valeurs obtenues dans la même expérience avec des cellules de sujets témoins (donneurs sains de façon à normaliser les variations inter-essais).

Dans tous les groupes de patients, l'index d'adhésion est complètement effondré pendant le traitement, puis remonte progressivement entre J20 et J30. Un seul patient, du groupe I, a récupéré une adhésion normale à J15 et présente par ailleurs une immunisation importante contre le 25.3, avec présence d'anticorps anti-idiotypes. La récupération des capacités d'adhésion est en fait contemporaine de la désaturation des cellules circulantes.

On a aussi, au cours du traitement, analysé l'expression de la molécule LFA1 sur les lymphocytes des patients par cytofluorométrie. On a pu observer une diminution de l'intensité de fluorescence du CD11a révélé par le 25.3, pouvant atteindre 50 %, et ce dans les deux groupes. Cette modulation commence dès la première injection mais est plus importante entre J10 et J15. Elle s'accompagne d'une diminution tout à fait parallèle de l'expression du CD18, c'est-à-dire de la chaîne B de la molécule LFA1.

Sept des quatorze patients suivis ont présenté une immunisation, sans effets durant le traitement. Seuls quatre patients ont montré, après le traitement, des anticorps IgG de souts détectables au delà d'une dilution au 1/300.

En résumé le 25.3 est un anticorps non déplétant qui, aux doses utilisées, sature les sites LFA-1 présents sur les cellules circulantes et ainsi entraîne un blocage des capacités d'adhésion lymphocytaire LFA-1 dépendantes. Le traitement peut s'accompagner d'une modulation de

l'expression cellulaire de la molécule LFA1. Il est capable d'induire une réponse anticorps souvent faible mais parfois (1 cas/10 dans cette étude) importante, après la période de traitement, avec présence d'anti-idiotypes.

REVENDEICATIONS

1. Utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre la molécule LFA-1 humaine pour la préparation d'un médicament destiné au traitement de base de la prévention du rejet des greffes d'organes solides, notamment le rein, chez l'homme.

2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est dirigé contre la chaîne alpha de la molécule LFA-1.

3. Utilisation selon la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal réagit avec :

- les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages et les polymorphonucléaire ;
- 60 % environ des thymocytes et prothymocytes ;
- des lignées de cellules T ;
- la lignée KG1.

4. Utilisation selon l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est une IgG1 de souris.

5. Utilisation selon la revendication 4, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est l'anticorps 25.3 déposé auprès de la collection ECACC sous la référence 92 120 309.

6. Utilisation d'un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 selon l'une quelconque des revendications 1 à 5 pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir le rejet des greffes d'organes solides chez un receveur auquel le médicament est administré à raison d'environ 1 à 50 mg d'anticorps/jour, notamment d'environ 20 mg/jour.

7. Utilisation selon la revendication 6 pour la

préparation d'un médicament destiné à prévenir le rejet des greffes d'organes chez un receveur auquel le médicament est administré sur une période allant de 1 à 30 jours.

5 8. Utilisation selon la revendication 6 ou 7, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir le rejet des greffes d'organes solides chez un receveur auquel le médicament est administré par perfusion, notamment de l'ordre de 30 min.

10 9. Utilisation selon l'une des revendications 6 à 8, pour la préparation d'un médicament destiné à prévenir le rejet d'organes chez un receveur auquel le médicament est administré avec une dose de charge de 30 mg avant la revascularisation du greffon puis une dose journalière de 15 mg jusqu'au dixième jour.

15 10. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 humaine en solution à 1 mg/ml environ dans un véhicule approprié.

20 11. Médicament comprenant à titre de principe actif au moins un anticorps monoclonal dirigé contre la molécule LFA-1 humaine en solution aqueuse isotonique pour perfusion et au moins un agent de stabilisation tel que le tris (hydroxyméthyl) aminométhane et le Tween 80.

25 12. Médicament selon la revendication 11, caractérisé en ce que, pour une solution d'1 litre, il comprend de 0,1 à 10 g, notamment 1 g environ d'anticorps monoclonal, et de 0,1 à 10 g, notamment 2,4 g de tris (hydroxyméthyle) aminométhane ou analogue et de 0,1 à 10, et notamment 2 pour dix mille de Tween 80.

30 13. Médicament selon l'une quelconque des revendications 10 à 12, caractérisé en ce que l'anticorps

monoclonal est dirigé contre la chaîne alpha de la molécule LFA-1.

14. Médicament selon l'une quelconque des revendications 10 à 13, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal réagit avec :

- 60 % environ des cellules sanguines ;
- les lymphocytes T et B, les monocytes, les macrophages et les polymorphonucléaires ;
- 60 % environ des thymocytes ;
- des lignées de cellules T ;
- la lignée KG1.

15. Médicament selon l'une quelconque des revendications 10 à 14, caractérisée en ce que l'anticorps monoclonal est une IgG1 de souris.

16. Médicament selon la revendication 14, caractérisé en ce que l'anticorps monoclonal est l'anticorps 25.3 déposé auprès de la collection ECACC sous la référence 92/20309.

17. Kit pour l'administration simultanée, séparée ou étalée dans le temps, en vue de la prévention des rejets de greffe d'organes solides, comprenant un médicament dont le principe actif est au moins un anticorps dirigé contre la molécule LFA-1 humaine et au moins un autre composé actif en matière de prévention des greffes d'organes.

18. Kit selon la revendication 17, caractérisé en ce que le ou les autres composés actifs sont choisis parmi le groupe constitué par la Cyclosporine A, l'Azathioprine, les stéroïdes tels que la Prednisone.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/00071

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 A61K39/395 //(A61K39/395,37:02),(A61K39/395,31:52),(A61K39/395,31:57)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TRANSPLANTATION vol. 52, no. 2 , August 1991 , BALTIMORE, MD, ETATS-UNIS pages 291 - 296 B. LE MAUFF ET AL. 'Effect of anti-LFA1 (CD11a) monoclonal antibodies in acute rejection in human kidney transplantation.' cited in the application see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 May 1994

Date of mailing of the international search report

02-06-1994

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Nooij, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR 94/00071

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>TRANSPLANTATION vol. 53, no. 4 , 1992 , BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS pages 840 - 849 P. BERLIN ET AL. 'Monoclonal antibodies against human T cell adhesion molecules. Modulation of immune function in nonhuman primates.' cited in the application see abstract ---</p>	1-4,6-15
X	<p>M. ISOBE, Dans: 'Proc. of the International Congress of Immunology', Budapest, 23-28 aout 1992 (Ed. Hungarian Soc. for Immunol.), Springer, Berlin, 1992 cited in the application see page 554, abstract W-90-19 ---</p>	1-3,6-14
X	<p>B. LEMAUFF et al., Dans: 'Proc. of the International Congress of Immunology', Budapest, 23-28 aout 1992 (Ed. Hungarian Soc. for Immunol.), Springer, Berlin, 1992. see page 603, abstract W-97-30 ---</p>	1-3,6-14
A	<p>WO,A,89 04175 (DANA FARBER CANCER INSTITUTE INC. & DANA FARBER CANCER) 18 May 1989 see page 14, line 1 - line 19 see claims ---</p>	1-18
P,X	<p>US,A,5 209 928 (MAWAS ET AL.) 11 May 1993 see the whole document ---</p>	1-18
P,X	<p>TRANSPLANTATION vol. 55, no. 2 , February 1993 , BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS pages 418 - 422 A. TALENTO ET AL. 'A single administration of LFA-1 antibody confers prolonged allograft survival.' see abstract -----</p>	1-3,6-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 94/00071

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-8904175	18-05-89	US-A- 5002869	26-03-91
		AU-A- 2611488	01-06-89
		CA-A- 1305928	04-08-92
		EP-A- 0387286	19-09-90
		JP-T- 3501804	25-04-91

US-A-5209928	11-05-93	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

 Demande internationale No
 PCT/FR 94/00071

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE

CIB 5 A61K39/395 //(A61K39/395,37:02),(A61K39/395,31:52),(A61K39/395,31:57)

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 5 A61K C07K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	TRANSPLANTATION vol. 52, no. 2, Août 1991, BALTIMORE, MD, ETATS-UNIS pages 291 - 296 B. LE MAUFF ET AL. 'Effect of anti-LFA1 (CD11a) monoclonal antibodies in acute rejection in human kidney transplantation.' cité dans la demande voir abrégé --- -/--	1-18

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

T document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention

X document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément

Y document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier

Z document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 Mai 1994

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

02-06-1994

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

 Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Nooij, F

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	<p>TRANSPLANTATION vol. 53, no. 4 , 1992 , BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS pages 840 - 849 P. BERLIN ET AL. 'Monoclonal antibodies against human T cell adhesion molecules. Modulation of immune function in nonhuman primates.' cité dans la demande voir abrégé</p> <p>---</p>	1-4,6-15
X	<p>M. ISOBE, Dans: 'Proc. of the International Congress of Immunology', Budapest, 23-28 août 1992 (Ed. Hungarian Soc. for Immunol.), Springer, Berlin, 1992 cité dans la demande voir page 554, abrégé W-90-19</p> <p>---</p>	1-3,6-14
X	<p>B. LEMAUFF et al., Dans: 'Proc. of the International Congress of Immunology', Budapest, 23-28 août 1992 (Ed. Hungarian Soc. for Immunol.), Springer, Berlin, 1992. voir page 603, abrégé W-97-30</p> <p>---</p>	1-3,6-14
A	<p>WO,A,89 04175 (DANA FARBER CANCER INSTITUTE INC. & DANA FARBER CANCER) 18 Mai 1989 voir page 14, ligne 1 - ligne 19 voir revendications</p> <p>---</p>	1-18
P,X	<p>US,A,5 209 928 (MAWAS ET AL.) 11 Mai 1993 voir le document en entier</p> <p>---</p>	1-18
P,X	<p>TRANSPLANTATION vol. 55, no. 2 , Février 1993 , BALTIMORE, MD, ÉTATS-UNIS pages 418 - 422 A. TALENTO ET AL. 'A single administration of LFA-1 antibody confers prolonged allograft survival.' voir abrégé</p> <p>-----</p>	1-3,6-14

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR 94/00071

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-8904175	18-05-89	US-A- 5002869	26-03-91
		AU-A- 2611488	01-06-89
		CA-A- 1305928	04-08-92
		EP-A- 0387286	19-09-90
		JP-T- 3501804	25-04-91

US-A-5209928	11-05-93	AUCUN	
